

Docket No.: 06181/0201899-US0
(PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Sun-Chang Kim et al.

Application No.: Not Yet Assigned

Confirmation No.:

Filed: Concurrently Herewith

Art Unit: N/A

For: ANTIMICROBIAL PEPTIDE, ITS ANALOGS
AND ANTIMICROBIAL COMPOSITION
COMPRISING THEM

Examiner: Not Yet Assigned

CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Korea	10-2002-0016445	March 26, 2002

A certified copy of the aforesaid Patent Application was received by the International Bureau on April 15, 2003 during the pendency of International Application No. PCT/KR03/000602. A copy of Form PCT/IB/304 is enclosed.

Dated: September 23, 2004.

Respectfully submitted,

By


S. Peter Ludwig

Registration No.: 25,351

(212) 527-7700

(212) 753-6237 (Fax)

Attorneys/Agents For Applicant

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

PARK, Jang-Won
200, Nonhyun-Dong, Kangnam-Ku
Seoul 135-010
Republic of Korea

Date of mailing (day/month/year) 14 May 2003 (14.05.03)	
Applicant's or agent's file reference PAKAIST03149	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/KR03/00602	International filing date (day/month/year) 26 March 2003 (26.03.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 26 March 2002 (26.03.02)
Applicant KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
26 Marc 2002 (26.03.02)	10-2002-0016445	KR	15 Apr 2003 (15.04.03)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338-70-90

Authorized officer

Lombardi, Tamira

Telephone No. (41-22) 338 1

PCT/KR 03/00602

KO/KR

26.03.2003

REC'D 15 APR 2003

WIPO PCT

대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0016445
Application Number PATENT-2002-0016445

출원년월일 : 2002년 03월 26일
Date of Application MAR 26, 2002

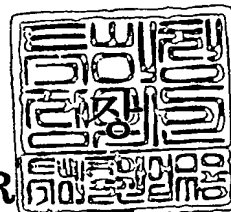
출원인 : 한국과학기술원
Applicant(s) Korea Advanced Institute of Science and Technology



2002 년 12 월 31 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0008
【제출일자】	2002.03.26
【국제특허분류】	C07K 14/00
【발명의 명칭】	항균 활성을 갖는 펩타이드, 이들의 유도체 및 이들을 포함하는 항균 조성물
【발명의 영문명칭】	ANTIMICROBIAL PEPTIDE, ITS ANALOGS AND ANTIMICROBIAL COMPOSITION COMPRISING THEREOF
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【대리인】	
【성명】	박장원
【대리인코드】	9-1998-000202-3
【포괄위임등록번호】	2002-009494-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김선창
【성명의 영문표기】	KIM, Sun Chang
【주민등록번호】	560317-1057716
【우편번호】	305-335
【주소】	대전광역시 유성구 궁동 다솔아파트 103-702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박인엽
【성명의 영문표기】	PARK, In Yup
【주민등록번호】	730927-1011321
【우편번호】	463-792
【주소】	경기도 성남시 분당구 야탑동 장미현대아파트 833-1703
【국적】	KR

【발명자】**【성명의 국문표기】** 조주현**【성명의 영문표기】** CHO, Ju Hyun**【주민등록번호】** 710210-1319616**【우편번호】** 302-748**【주소】** 대전광역시 서구 월평3동 하나로아파트 110동 1206호**【국적】** KR**【심사청구】** 청구**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】****【서열개수】** 72**【서열목록의 전자파일】** 첨부**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 박장원 (인)**【수수료】****【기본출원료】** 20 면 29,000 원**【가산출원료】** 31 면 31,000 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 9 항 397,000 원**【합계】** 457,000 원**【감면사유】** 정부출연연구기관**【감면후 수수료】** 228,500 원**【첨부서류】** 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 염기성 아미노산 잔기와 소수성 아미노산 잔기를 번갈아 포함함으로써, 균 세포 내로 침투하여 작용 가능하여, 종래의 균 세포막에 작용하던 항균 펩타이드보다 우수한 항균활성을 가지는 신규한 항균 펩타이드, 이들의 유도체 및 이들을 포함하는 항균 조성물에 관한 것이다.

【대표도】

도 1a

【명세서】

【발명의 명칭】

항균 활성을 갖는 펩타이드, 이들의 유도체 및 이들을 포함하는 항균 조성물
 {ANTIMICROBIAL PEPTIDE, ITS ANALOGS AND ANTIMICROBIAL COMPOSITION COMPRISING THEREOF}

【도면의 간단한 설명】

도 1a 내지 1d는 신규한 항균 펩타이드의 세포침투 활성을 공초점 현미경(confocal microscope)으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<2> 본 발명은 항균 활성을 갖는 펩타이드들에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 박테리아와 진균을 포함하여 폭넓은 범위의 미생물에 대하여 강력한 항균활성을 나타내는 신규한 펩타이드와 이들을 포함하는 항균 조성물에 관한 것이다.

<3> 미생물의 침입에 대한 곤충의 방어기작에 관한 연구결과로부터 누에 애벌레에서 새로운 펩타이드 항균제인 세크로핀이 발견된 이후로, 생리활성 물질로서 펩타이드의 중요성이 크게 인식되었다. 최근 수 년 간의 연구결과, 거의 모든 고등생물이 병원성 미생물에 대한 방어수단으로서 면역체계와 별도의 항균 펩타이드를 체내에 축적하거나 분비하는 것으로 알려졌다. 현재까지 약 2,000 종 이상의 항균 펩타이드가 발견되었으며, 이들 펩타이드들은 발견된 종마다 그 아미노산 조성이 상이하지만 항균 작용기작은 유사한 것으로 알려지고 있다. 대표적인 항균 펩타이드로서 세크로핀(cecropin), 머게이닌

(magainin), 붐비닌(bombinin), 디펜신(defensin), 타키플레신(tachyplesin) 및 부포린(buforin) 등이 알려졌는데, 이들 항균 펩타이드들은 공통적으로 17-24개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 그람 음성균 및 그람 양성균 뿐만 아니라 원핵생물 또는 곰팡이 등 에 대해서도 항균력을 가지며, 일부는 암세포와 바이러스에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 특히, 상기 펩타이드 항균제 중 머게이닌은 양서류 표피에서 분리된 23개의 아미노산 조성을 갖는 펩타이드(Zasloff, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5449-5453)로서, 병원균 뿐 아니라 인체의 폐암세포에도 작용하는 것으로 보고되었다. 또한, 항균 펩타이드의 대부분은 특이적으로 세포에 작용하여 목적세포를 신속하게 죽이고, 대부분 넓은 범위에서 활성 스펙트럼을 나타낸다(Park, C.B., Kim, M.S. and Kim, S.C. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 218:408-413).

- <4> 상기 항균 펩타이드들은,
- <5> 첫째, 광범위한 미생물에 대하여 강력한 항균력을 가지며,
- <6> 둘째, 숙주세포는 파괴하지 않으면서 외부에서 침입한 병원균에만 작용하여 인체에 무해한 항생물질로서 작용하며,
- <7> 셋째, 미생물의 내성유발이 문제시되고 있는 종래의 항생제와는 전혀 다른 활성기작으로 항균활성을 나타내므로 내성유발 가능성이 적고,
- <8> 넷째, 글리코실레이션(glycosylation)과 같은 2차 변형(secondary modification)이 없기 때문에 유전자 조작을 통하여 대량 생산할 수 있으며,
- <9> 다섯째, 열, 산 또는 알칼리 등에 강한 이화학적 안정성을 가지고 있기 때문에 제약 및 식품분야에서의 산업적 이용성이 매우 크다는 장점을 갖는다.

- <10> 현재까지 보고된 항균 펩타이드의 작용기작은 크게 두 가지로 분류된다.
- <11> 첫째, 대부분의 항균 펩타이드들은 균의 세포막의 투과성을 증가시켜 막전위를 파괴하고 세포대사를 멈추게 하는 작용기작을 갖는다. 이러한 작용기작을 나타내는 항균 펩타이드들의 생화학적 및 구조적 특성들에 대한 방대한 연구결과들이 보고되고 있다.
- <12> 둘째, 이 외의 소수의 항균 펩타이드들은 균 세포내로 침투하여 DNA 또는 RNA와 결합하여 전사(transcription) 또는 번역(translation)을 억제하는 강력한 작용기작을 나타내지만, 현재 이들에 대한 연구는 거의 전무한 상태이다. 그러나, 항생제 내성균의 출현으로 새로운 작용기작을 갖는 항생제의 개발이 활발하게 진행되고 있는 현 시점에서, 세포내로 직접 침투하여 작용하는 항균 펩타이드의 작용기작 원리의 이해와 이러한 항균 펩타이드의 개발이 절실히 요구되고 있다.
- <13> 이들 세포 내로 침투하는 항균 펩타이드들의 활성화에 중요하다고 알려진 구조적인 요소로서,
- <14> 첫째, 양친매성 나선구조(amphipathic helix),
- <15> 둘째, 상기 나선구조를 안정화시키는 잔기들의 분포,
- <16> 셋째, 염기성 잔기들의 분포,
- <17> 넷째, 소수성 잔기들의 분포,
- <18> 다섯째, 전하를 띠는 잔기들과 나선구조의 쌍극자(dipole) 간의 상호작용, 및
- <19> 여섯째, 반대 전하를 띠는 잔기들 간의 염다리(salt-bridge)를 들 수 있다.

<20> 본 발명자들은 상기 사실에 착안하여 신규한 항균 펩타이드를 합성하고 이들 펩타이드들의 잔기를 치환, 추가, 또는 제거하여, 균 세포내로 침투 가능하고 증진된 항균력을 나타내는 유도체들을 선별하는 과정을 반복하여 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<21> 본 발명의 목적은 균 세포내로 침투 가능하여 종래의 항균 펩타이드에 대하여 내성을 갖는 균종에 대하여도 항균활성을 갖는 신규한 펩타이드 및 이들을 포함하는 항균 조성물을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명에 따른 항균 펩타이드는 종래의 항균 펩타이드와 비교하여 광범위한 균종에 대하여 강력한 항균활성을 가지며, 종래의 항균 펩타이드보다 독성이 적거나 없는 신규한 펩타이드이다.

【발명의 구성 및 작용】

<22> 본 발명은 항균 활성을 갖는 신규한 펩타이드에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 균 세포내로 침투하여 작용함으로써, 박테리아와 진균을 포함하는 광범위한 미생물에 대하여 강력한 항균활성을 나타내는 신규한 펩타이드와 이들의 유도체 이들을 포함하는 항균 조성물에 관한 것이다.

<23> 본 발명에서 사용된 아미노산 서열은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 다음과 같이 약어로 기재하였다.

<24>	알라닌	A	아르기닌	R
<25>	아스파라긴	N	아스파르트산	D
<26>	시스테인	C	글루탐산	E
<27>	글루타민	Q	글라이신	G

<34> 본 발명에 의한 항균 펩타이드는 비교적 보존적인 일정한 서열을 갖는 중심단편과 상기 중심단편의 N-말단과 C-말단 쪽에 염기성 아미노산(basic amino acid)과 소수성 아미노산(hydrophobic amino acid)이 번갈아 위치하는 펩타이드 단편을 포함함으로써, 전체 펩타이드의 이차구조가 안정화되어, 균 세포 내로 직접 침투하여 항균작용을 할 수 있다.

<35> 이 때, 상기 소수성 아미노산으로서 모든 소수성 아미노산이 가능하며, 특히, 알라닌, 발린, 루신, 또는 이소루신 등이 바람직하다. 또한, 상기 염기성 아미노산으로서 모든 염기성 아미노산이 가능하며, 특히, 리신, 아르기닌 또는 히스티딘 등이 바람직하다.

<36> 본 발명은 다음의 서열 일반식(I)로 표현되는 서열의 펩타이드를 포함하는 항균 펩타이드 유도체를 제공한다.

<37> (I) [N-말단 - X¹ X² X³ X⁴ X⁵ X⁶ X⁷ X⁸ X⁹ X¹⁰ X¹¹ X¹² X¹³ X¹⁴ X¹⁵ - C- 말단]

◁ 38 ▷ 『 중심단편 』

<39> 여기서,

- <40> X1은 없거나 하나의 염기성 아미노산이고;
- <41> X2는 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;
- <42> X3은 하나의 염기성 아미노산이고;
- <43> X4는 글루타민 또는 아스파라긴이고;
- <44> X5는 페닐알라닌 또는 트립토판이고;
- <45> X6은 프롤린이고;
- <46> X7은 이소루신 또는 발린이고;
- <47> X8은 글리신이고;
- <48> X9는 하나의 염기성 아미노산이고;
- <49> X10은 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;
- <50> X11은 서로 같거나 서로 다른 두 개의 염기성 아미노산이고;
- <51> X12는 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;
- <52> X13은 서로 같거나 서로 다른 두 개의 염기성 아미노산이고;
- <53> X14는 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;
- <54> X15는 없거나 하나의 염기성 아미노산이다.
- <55> 상기 소수성 아미노산으로서 모든 소수성 아미노산이 가능하며, 특히, 알라닌, 발린, 루신, 또는 이소루신 등이 바람직하다. 또한, 상기 염기성 아미노산으로서 모든 염기성 아미노산이 가능하며, 특히, 리신, 아르기닌 또는 히스티딘 등이 바람직하다. 이

<56> 또한, 본 발명의 상기 서열 일반식(I)의 중심단편(X⁴ X⁵ X⁶ X⁷ X⁸)을 기준으로 N-말단과 C-말단 쪽의 단편의 위치를 바꾸어 포함하는, 다음의 서열 일반식(II)로 표현되는 서열을 포함하는 항균 펩타이드 유도체를 제공한다.

◁ 58 ▷ 『 중심단편 』

<60> X¹은 없거나 하나의 염기성 아미노산이고;

<61> χ^2 는 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;

<62> X³은 하나의 열기성 아미노산이고;

<63> X⁴는 클루타민 또는 아스파라긴이고;

<64> X5는 페닐알라닌 또는 트립토판이고;

<65> X^6 은 프롤린이고;

<66> X⁷은 이소루신 또는 발린이고;

<67> X^8 은 클리신이고;

<68> X^9 는 하나의 염기성 아미노산이고;

<69> X^{10} 은 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;

<70> X¹¹은 서로 같거나 서로 다른 두 개의 염기성 아미노산이고;

- <71> X¹²는 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;
- <72> X¹³은 서로 같거나 서로 다른 두 개의 염기성 아미노산이고;
- <73> X¹⁴는 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;
- <74> X¹⁵는 없거나 하나의 염기성 아미노산이다.
- <75> 상기 소수성 아미노산으로서 모든 소수성 아미노산이 가능하며, 특히, 알라닌, 발린, 루신, 또는 이소루신 등이 바람직하다. 또한, 상기 염기성 아미노산으로서 모든 염기성 아미노산이 가능하며, 특히, 리신, 아르기닌 또는 히스티딘 등이 바람직하다. 이 때, 상기 항균펩타이드는 표 1 및 서열목록의 서열번호 35 내지 68로 표현되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 포함할 수 있다.
- <76> 또한, 본 발명은 상기 서열 일반식(I)과 (II)로 표현되는 서열을 갖는 펩타이드 중에서 C-말단이 아미드화된 펩타이드를 포함하는 항균 펩타이드 유도체를 제공한다. 이 때, 상기 항균 펩타이드는 표 1 및 서열목록의 서열번호 69 내지 72로 표현되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 포함할 수 있다. 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, C-말단이 아미드화된 항균펩타이드는 그람양성균, 그람음성균 및 곰팡이균에 대하여 보다 증진된 항균활성을 나타낸다.
- <77> 또한, 본 발명은 유효성분으로서 본 발명에 따른 항균 펩타이드 중 한 가지 이상을 약리학적 유효량으로 포함하는 항균 조성물을 제공한다. 상기 항균 조성물은 본 발명에 따른 항균 펩타이드 이 외에, 약리학적으로 허용되는 담체 또는 공지된 다른 항균물질을 포함할 수도 있다.

- <78> 본 발명에 따른 펩타이드는 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려진 방법, 예컨대 자동 펩타이드 합성기에 의하여 합성할 수 있으며, 예컨대 유전자 조작을 통하여 본 발명의 펩타이드를 포함하는 융합단백질을 인코딩하는 유전자를 합성하고, 이를 이용하여 숙주 미생물을 형질전환시킨 후, 숙주 미생물에서 융합단백질을 분리하여 원하는 펩타이드를 얻는 것과 같은 유전자 조작 기술에 의하여 생산할 수도 있다.
- <79> 본 발명의 바람직한 구체예에 따른 항균 펩타이드 유도체의 제조방법은
- <80> 자동 펩타이드 합성기를 이용하여 펩타이드를 합성하는 단계,
- <81> 상기 합성된 펩타이드의 항균 활성, 세포침투활성, 및 용혈활성을 측정하는 단계,
- <82> 상기 합성된 펩타이드의 아미노산 잔기를 치환, 추가, 또는 제거시킨 펩타이드 유도체들을 합성하는 단계,
- <83> 상기 단계들을 반복하여 강한 항균력과 안전성이 높은 펩타이드 유도체를 선별하는 단계로 구성된다.
- <84> 본 발명에서는 대상 미생물로서 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*, ATCC 62037), 스타필로코커스 오레우스(*Staphylococcus aureus*, ATCC 15752) 및 스트렙토코커스 무탄스(*Streptococcus mutans*, ATCC 25175)와 같은 그람양성균, 에스케리차 콜라이(*Escherichia coli*, ATCC 27325), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*, ATCC 15277) 및 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*, ATCC 17426)와 같은 그람음성균, 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*, ATCC 10231), 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*, ATCC 44774) 및 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus*

neoformans, ATCC 34881)와 같은 곰팡이균을 사용하였으며, 이들 미생물들을 미국 균주 배양 컬렉션(American Type Culture Collection; ATCC)으로부터 얻었다.

<85> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

<86> 실시예

<87> 실시예1

<88> 신규한 항균 펩타이드 유도체의 제조

<89> 자동 펩타이드 합성기(Milligen 9050, Millipore, 미국)를 이용하여 하기의 표 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 합성하고, C18 역상 고속액체크로마토그래피(Waters Associates, USA)를 이용하여 이들 합성된 펩타이드를 순수분리하였다.

<90>

【표 1】

펩타이드 유도체의 아미노산 서열

펩타이드	아미노산 서열
서열번호 1	RVVRQWP IGRVVRRVVRRVV R
서열번호 2	KVVKQWP IGRVVKKVVKKVV K
서열번호 3	RLLRQWP IGRLLRRLRLRL R
서열번호 4	KLLKQWP IGRLLKKLLKKLL K
서열번호 5	RVLRQWP IGRVLRRLVLRRL R
서열번호 6	KVLKQWP IGRVLLKKVLLKKV LK
서열번호 7	RLVRQWP IGRVLRRRLVRR LVR
서열번호 8	KLVKQWP IGRVKKLVKKLV KLVK
서열번호 9	RVVKQWP IGRVVKRVVKKRV VK
서열번호 10	KVVRQWP IGRVVRRVVRRVV R
서열번호 11	RLLRQWP IGRLLKRLRLKRL LK
서열번호 12	KLLRQWP IGRLLRKLRLRL R
서열번호 13	RVLRQWP IGRVLRVLRVLRV LK
서열번호 14	KVLRQWP IGRVLRKVLRKV LK
서열번호 15	RLVKQWP IGRVLKRLVKRLV K
서열번호 16	KLVRQWP IGRVLRKLVRKL VLR
서열번호 17	KLVRQFPVGRVLRKLVRKL VLR
서열번호 18	RVVRNWP IGRVVRRVVRRVV R
서열번호 19	KVVKNWP IGRVVKKVVKKVV K
서열번호 20	RLLRNWP IGRLLRRLRLRL R
서열번호 21	KLLKNWP IGRLLKKLLKKLL K
서열번호 22	RVLRNWP IGRVLRRLVLRRL VLR
서열번호 23	KVLKNWP IGRVLLKKVLLKKV LK
서열번호 24	RLVRNWP IGRVLRRRLVRR LVR
서열번호 25	KLVKNWP IGRVKKLVKKLV KLVK
서열번호 26	RVVKNWP IGRVVKRVVKKRV VK
서열번호 27	KVVRNWP IGRVVRRVVRRVV R
서열번호 28	RLLRNWP IGRLLKRLRLKRL LK
서열번호 29	KLLRNWP IGRLLRKLRLRL R
서열번호 30	RVLRNWP IGRVLRVLRVLRV LK
서열번호 31	KVLRNWP IGRVLRKVLRKV LK
서열번호 32	RLVRNWP IGRVLKRLVKRLV K
서열번호 33	KLVRNWP IGRVLRKLVRKL VLR
서열번호 34	KLVRNFPVGRVLRKLVRKL VLR
서열번호 35	RVVRRVVRRVVRRQWP IGRVV R
서열번호 36	KVVKKVVKVVVKQWP IGRVV K
서열번호 37	RLLRRLRLRLRLRQWP IGRLL R
서열번호 38	KLLKKLLKKLLKQWP IGRLL K
서열번호 39	RVLRRLVLRRLVLRQWP IGRV LK
서열번호 40	KVLKKVLLKKVLLKQWP IGRV LK
서열번호 41	RLVRRRLVRRRLVRRQWP IGRV LK
서열번호 42	KLVKKLVKKLVKKQWP IGRV LK
서열번호 43	RVVKRVVKRVVKQWP IGRV VK
서열번호 44	KVVRKVVRKVVRQWP IGRV VK
서열번호 45	RLLRLLKRLRLKQWP IGRLL K
서열번호 46	KLLRKLRLKLRLRQWP IGRLL R
서열번호 47	RVLRVLRVLRVLRQWP IGRV LK
서열번호 48	KVLRKVLRKVLRQWP IGRV LK
서열번호 49	RLVKRLVLRVLRQWP IGRV LK
서열번호 50	KLVRKLVRKLVRQWP IGRV LK
서열번호 51	KLVRKLVRKLVRQFPVGRV LK
서열번호 52	RVVRRVVRRVVRRNWP IGRV VK
서열번호 53	KVVKKVVKVVVKVKNWP IGRV VK
서열번호 54	RLLRRLRLRLRLRNWP IGRLL R

【표 1a】

서열번호 55	KLLKKLLKLLKNWPIGKLLK
서열번호 56	RVLRRLRRVLRNWPIGRVLR
서열번호 57	KVLKKVLKVLKNWPIGKVLK
서열번호 58	RLVRRLLVRRVLRNWPIGRLVR
서열번호 59	KLVKKLVLKVLKNWPIGKLVK
서열번호 60	RVVKRVVKRVVKKNWPIGRVVK
서열번호 61	KVVRKVVRKVVRNWPIGKVVR
서열번호 62	RLVKRLLKRLKNWPIGRLLK
서열번호 63	KLLRKLRLKLLRNWPIGKLLR
서열번호 64	RVLRVLRVLRVLRNWPIGRVLR
서열번호 65	KVLKRVLRVLRNWPIGKVLK
서열번호 66	RLVKRLVLRVLRNWPIGRLVK
서열번호 67	KLVRKLVLRVLRNWPIGKLVK
서열번호 68	KLVRKLVLRVLRNFPVVKLVK
서열번호 69	KLVRQWPVIGKLVKLVKLVK-amide
서열번호 70	RLVKKNWPVIGRLVKRLVK-amide
서열번호 71	KVLKRVLRVLRQWPVIGKVLK-amide
서열번호 72	RVLRVLRVLRVLRNWPVIGRVLRK-amide

<92> 실시예 2<93> 펩타이드 및 유도체의 항균 활성 측정

<94> 실시예 1에서 제조한 펩타이드의 미생물에 대한 항균 활성을 96-웰 마이크로다이트루션 최소저해농도 측정법(minimal inhibitory concentration assay)으로 측정하였다. 박테리아와 곰팡이를 트립티케이즈 콩육즙 배지(trypticase soy broth ; TSB)와 사브로 배지(Saboraud ; SAB)에서 각각 37℃와 30℃에서 밤새워 키운 후, 이들을 새 배지에 접종하여 2시간 키워 균주들이 대수기가 되도록 하였다. 이들을 1 ml 당 10⁵ 균주가 되도록 희석한후 96-웰 플레이트에 190 μ l 씩 접종하고, 순차적으로 희석되어 있는 펩타이드를 각 웰에 10 μ l 씩 처리하였다. 96-웰 플레이트를 12시간 배양하여 각 웰의 흡광도를 측정하여 균주가 전혀 자라지 못하게 하는 최소농도를 최소저해농도로 정하였으며, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

<95> 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, 비교대상으로서 실시예에 포함된 머게이닌 (magainin)의 경우, 그람양성균, 그람음성균 및 진균에 대하여 32-128 μ g/ml의 최소저해 농도를 나타낸 반면, 실시예 1에서 제조한 펩타이드들은 1-2 μ g/ml의 최소저해농도를 나타내었다. 이는 실시예 1에서 제조한 펩타이드들이 머게이닌보다 약 32-128배 더 강한 항균활성을 갖는 것을 나타낸다.

<96> 【표 2】

펩타이드 유도체의 최소저해농도

미생물	최소저해농도(μ g/ml)											
	서열번호											
	1	2	3	4	5	8	10	11	13	16	17	
그람양성균												
<i>Bacillus subtilis</i>	2	1	2	2	1	1	1	1	2	2	2	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Streptococcus mutans</i>	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	
그람음성균												
<i>Escherichia coli</i>	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Salmonella enteritidis</i>	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	
<i>Pseudomonas putida</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
곰팡이												
<i>Candida albicans</i>	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	

<97>

미생물	최소저해농도(μ g/ml)											
	서열번호											
	18	19	20	21	23	24	26	29	31	32	34	
그람양성균												
<i>Bacillus subtilis</i>	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Streptococcus mutans</i>	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	
그람음성균												
<i>Escherichia coli</i>	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	
<i>Salmonella enteritidis</i>	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	
<i>Pseudomonas putida</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
곰팡이												
<i>Candida albicans</i>	1	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1	

<98>

미생물	최소저해농도($\mu\text{g/ml}$)										
	서열번호										
	35	36	37	38	39	42	44	45	47	50	51
그램양성균											
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
<i>Streptococcus mutans</i>	1	2	1	2	2	2	2	1	2	1	1
그램음성균											
<i>Escherichia coli</i>	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1
<i>Salmonella enteritidis</i>	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2
<i>Pseudomonas putida</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
곰팡이											
<i>Candida albicans</i>	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2

<99>

미생물	최소저해농도($\mu\text{g/ml}$)										
	서열번호										
	52	53	54	55	57	58	60	63	65	66	68
그램양성균											
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
<i>Streptococcus mutans</i>	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2
그램음성균											
<i>Escherichia coli</i>	1	1	2	2	2	1	2	1	1	2	1
<i>Salmonella enteritidis</i>	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1
<i>Pseudomonas putida</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
곰팡이											
<i>Candida albicans</i>	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2

<100>

미생물	최소저해농도($\mu\text{g/ml}$)				
	서열번호				
	69	70	71	72	Magainin
그램양성균					
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	64
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1	1	64
<i>Streptococcus mutans</i>	1	2	1	2	128
그램음성균					
<i>Escherichia coli</i>	1	1	1	1	128
<i>Salmonella enteritidis</i>	2	1	1	1	32
<i>Pseudomonas putida</i>	1	1	1	1	64
곰팡이					
<i>Candida albicans</i>	1	1	1	1	32
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	1	1	1	32
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	1	2	2	32

<101> 실시예 3

<102> 펩타이드 및 유도체의 세포침투 활성 측정

<103> 실시예 1에서 제조한 펩타이드의 세포침투 활성을 공초점 현미경으로 관찰하였다. 대장균(*E. coli*)을 TSB 배지에 접종하여 37℃에서 하룻밤 동안 키운 후, 새 배지에 재접종하고 2시간 동안 키워서 대수기가 되도록 하였다. 그리고 나서, 10 mM NAPB(sodium phosphate buffer)로 대장균 세포들을 세척하고, 10^5 CFU/ml가 되도록 희석시킨 후, 폴리-L-리신으로 코팅된 글래스 슬라이드에 상기 희석시킨 대장균 세포들을 30분간 고정시켰다. 실시예 1에서 제조한 펩타이드들의 N-말단을 FITC(fluoresceinisothiocyanate)로 라벨링하고, 이를 글래스 슬라이드에 고정시킨 대장균에 5분간 처리하였다. 글래스 슬라이드를 10 mM NAPB로 세척하고 공초점 현미경으로 관측한 결과를 도 1에 나타내었다.

<104> 도 1a, 1b 및 1c는 각각 실시예 1의 서열번호 1, 33 및 65 펩타이드가 대장균 세포 내로 침투한 것을 나타내는 공초점 현미경 사진이다. 도 1d는 세포막에 결합하여 균을 죽이는 작용기작을 가진 머게이닌으로 처리한 대장균의 공초점 현미경 사진이다.

<105> 실시예4<106> 펩타이드 및 유도체의 용혈 활성 측정

<107> 인간혈액 (hRBC) 3ml을 원심분리하여 침전된 혈구를 분리한 후, 이를

PBS(phosphate buffered saline) 완충용액으로 세척하고, 20 ml가 되도록 희석하였다.

이와 같이 준비한 적혈구 용액 190 μ l에 상기 실시예 1에서 제조한 펩타이드 시료(4 μ g/ μ l)를 10 μ l씩 최종 펩타이드 농도가 200 μ g/ml이 되도록 첨가하여 37℃에서 1 시간동안 반응시키고, 4000 rpm에서 5 분동안 원심분리하였다. 각 시료의 상층액 100 μ l를 취하여 PBS 완충용액으로 10배 희석한 후, 576 nm에서의 흡광도(A_{567})를 측정하였다. 0.2% 트리톤 X-100으로 처리한 시료의 흡광도를 100% 용혈반응으로 정하고, 각 시료의 상대적 흡광도를 측정하여 %용혈반응을 정하여, 그 결과를 표 3에 나타내었다.

<108> 표 3에서 알 수 있는 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 펩타이드들은 모두 1% 미만의 용혈활성을 나타내었다. 이러한 결과는 실시예 1에서 제조한 펩타이드들이 인체세포에 무해하다는 것을 나타내는 것이다. 비교대상으로 실시예에 포함된 멜리틴(melittin)은 용혈 펩타이드이며 200 μ g/ml의 농도에서 거의 모든 적혈구를 파괴하는 것으로 관찰되었다.

<109> 【표 3】

펩타이드 유도체의 용혈활성

서열번호	A ₅₆₇	%용혈반응	서열번호	A ₅₆₇	%용혈반응
1	0.013	0.4	18	0.014	0.4
2	0.017	0.5	19	0.015	0.5
3	0.022	0.6	20	0.018	0.6
4	0.025	0.8	21	0.012	0.4
5	0.019	0.6	23	0.013	0.4
8	0.021	0.7	24	0.016	0.5
10	0.016	0.5	26	0.011	0.3
11	0.013	0.4	29	0.015	0.5
13	0.011	0.3	31	0.012	0.4
16	0.014	0.4	32	0.013	0.4
17	0.012	0.4	34	0.011	0.3

<110>

서열번호	A ₅₆₇	%용혈반응	서열번호	A ₅₆₇	%용혈반응
35	0.017	0.5	52	0.016	0.5
36	0.018	0.6	53	0.015	0.5
37	0.016	0.5	54	0.010	0.3
38	0.019	0.6	55	0.020	0.6
39	0.022	0.6	57	0.025	0.8
42	0.014	0.4	58	0.013	0.4
44	0.021	0.7	60	0.016	0.5
45	0.015	0.5	63	0.012	0.4
47	0.017	0.5	65	0.023	0.7
50	0.013	0.4	66	0.015	0.5
51	0.016	0.5	68	0.015	0.5

<111>

서열번호	A ₅₆₇	%용혈반응	서열번호	A ₅₆₇	%용혈반응
69	0.018	0.6	71	0.013	0.4
70	0.017	0.5	72	0.015	0.5
0.2% 트리톤 X-100	3.21	100	멜리틴	3.17	99

【발명의 효과】

<112> 상기한 바와 같이, 본 발명에서 합성한 신규한 항균 펩타이드 유도체들은 그람양성균, 그람음성균 및 진균 등에 대하여 강력한 항균작용을 나타내며, 상처부위에서 미생물 발현을 강력하게 억제하면서도 용혈활성은 거의 나타내지 않으므로, 상처 치료 촉진제, 외상 치료제, 구강 청정제 및 안약 등의 새로운 항균제로서 뛰어난 효과를 기대할 수 있으며, 따라서 생물 의약 산업상 매우 유용한 발명이라 할 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

다음의 서열 일반식(I)로 표현되는 아미노산 서열을 포함하는 항균 펩타이드:

(I) [N- 말단 - X¹ X² X³ X⁴ X⁵ X⁶ X⁷ X⁸ X⁹ X¹⁰ X¹¹ X¹² X¹³ X¹⁴ X¹⁵ - C- 말단]

단,

X¹은 없거나 하나의 염기성 아미노산이고;

X²는 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;

X³은 하나의 염기성 아미노산이고;

X⁴는 글루타민이나 아스파라긴이고;

X⁵는 페닐알라닌이나 트립토판이고;

X⁶은 프롤린이고;

X⁷은 이소루신이나 발린이고;

X⁸은 글리신이고;

X⁹는 하나의 염기성 아미노산이고;

X¹⁰은 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;

X¹¹은 서로 같거나 서로 다른 두 개의 염기성 아미노산이고;

X¹²는 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;

X¹³은 서로 같거나 서로 다른 두 개의 염기성 아미노산이고;

X¹⁴는 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고; .

X¹⁵는 없거나 하나의 염기성 아미노산임.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 서열번호(SEQ ID NO) 1 내지 34 중에서 선택된 어느 한 가지 아미노산 서열을 포함하는 항균 펩타이드.

【청구항 3】

다음의 서열 일반식(II)로 표현되는 아미노산 서열을 포함하는 항균 펩타이드:

(II) [N- 말단 - X¹⁵ X¹⁴ X¹³ X¹² X¹¹ X¹⁰ X⁹ X⁴ X⁵ X⁶ X⁷ X⁸ X³ X² X¹ - C-말단]
단,

X¹은 없거나 하나의 염기성 아미노산이고;

X²는 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;

X³은 하나의 염기성 아미노산이고;

X⁴는 글루타민이나 아스파라긴이고;

X⁵는 페닐알라닌이나 트립토판이고;

X⁶은 프롤린이고;

X⁷은 이소루신이나 발린이고;

X⁸은 글리신이고;

X⁹는 하나의 염기성 아미노산이고;

X¹⁰은 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;

X 11은 서로 같거나 서로 다른 두 개의 염기성 아미노산이고;

X12는 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;

X 13은 서로 같거나 서로 다른 두 개의 염기성 아미노산이고;

X14는 서로 같거나 서로 다른 두 개의 소수성 아미노산이고;

X15는 없거나 하나의 염기성 아미노산임.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 서열번호 33 내지 68 중에서 선택된 어느 한 가지 아미노산 서열을 포함하는 항균 펩타이드.

【청구항 5】

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 서열의 C-말단이 아미드화된 항균 펩타이드.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 서열번호 69 내지 72 중에서 선택된 어느 한 가지 아미노산 서열을 포함하는 항균 펩타이드.

【청구항 7】

제 1 항 내지 제 4 항에 따른 펩타이드 중 한 가지 이상을 약리학적 활성성분으로서 약리학적 유효량으로 포함하는 항균 조성물.

【청구항 8】

제 5 항에 따른 펩타이드 중 한 가지 이상을 약리학적 활성성분으로서 약리학적 유효량으로 포함하는 항균 조성물.

【청구항 9】

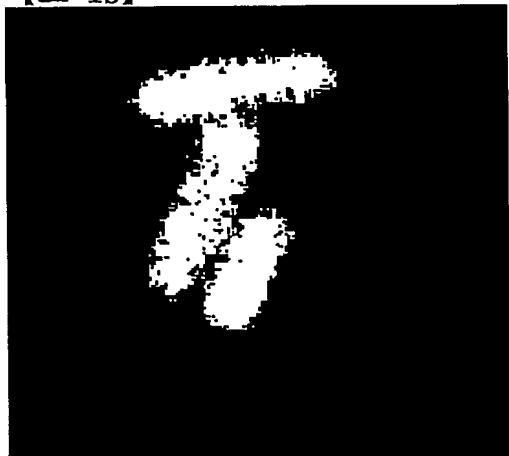
제 6 항에 따른 펩타이드 중 한 가지 이상을 약리학적 활성성분으로서 약리학적 유효량으로 포함하는 항균 조성물.

【도면】

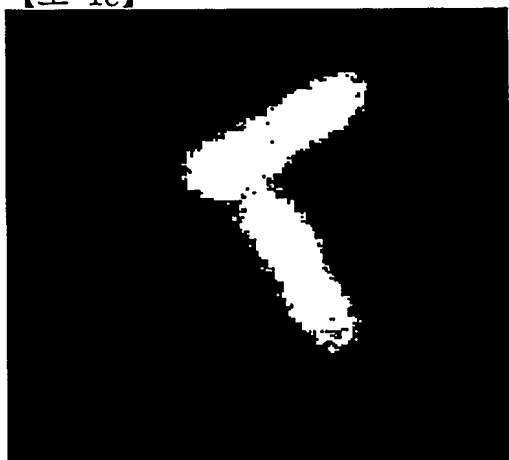
【도 1a】



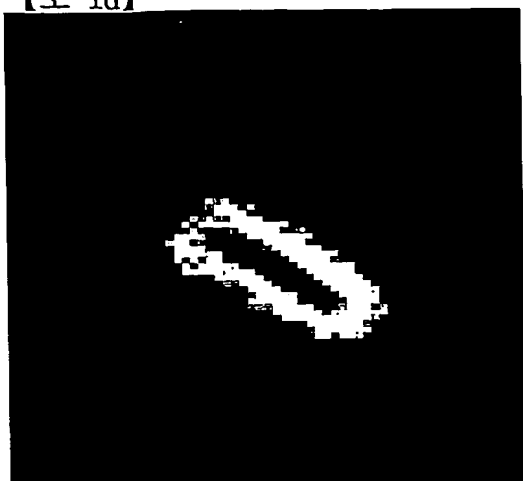
【도 1b】



【도 1c】



【도 1d】



【서열목록】

<110> Korea Advanced Institute of Science and Technology <120> ANTIMICROBIAL
 PEPTIDE AND ITS ANALOGS <160> 72 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 21
 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide
 <400> 1 Arg Val Val Arg Gln Trp Pro Ile Gly Arg Val Val Arg Arg Val Val 1
 5 10 15 Arg Arg Val Val Arg 20
 <210> 2 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 2 Lys Val Val Lys Gln Trp Pro Ile Gly Lys Val Val Lys
 Lys Val Val 1 5 10 15 Lys Lys Val
 Val Lys 20 <210> 3 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial
 Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 3 Arg Leu Leu Arg Gln Trp Pro
 Ile Gly Arg Leu Leu Arg Arg Leu Leu 1 5 10
 15 Arg Arg Leu Leu Arg 20 <210> 4 <211> 21 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 4 Lys Leu

Leu Lys Gln Trp Pro Ile Gly Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu 1 5
 10 15 Lys Lys Leu Leu Lys 20 <210> 5 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 5 Arg Val Leu Arg Gln Trp Pro Ile Gly Arg Val Leu Arg Arg Val Leu 1
 5 10 15 Arg Arg Val Leu Arg 20
 <210> 6 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 6 Lys Val Leu Lys Gln Trp Pro Ile Gly Lys Val Leu Lys
 Lys Val Leu 1 5 10 15 Lys Lys Val
 Leu Lys 20 <210> 7 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial
 Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 7 Arg Leu Val Arg Gln Trp Pro
 Ile Gly Arg Leu Val Arg Arg Leu Val 1 5 10
 15 Arg Arg Leu Val Arg 20 <210> 8 <211> 21 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 8 Lys Leu
 Val Lys Gln Trp Pro Ile Gly Lys Leu Val Lys Lys Leu Val 1 5
 10 15 Lys Lys Leu Val Lys 20 <210> 9 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 9 Arg Val Val Lys Gln Trp Pro Ile Gly Arg Val Val Lys Arg Val Val 1
 5 10 15 Lys Arg Val Val Lys 20
 <210> 10 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 10 Lys Val Val Arg Gln Trp Pro Ile Gly Lys Val Val
 Arg Lys Val Val 1 5 10 15 Arg Lys

Val Val Arg 20 <210> 11 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 11 Arg Leu Leu Lys
 Gln Trp Pro Ile Gly Arg Leu Leu Lys Arg Leu Leu 1 5
 10 15 Lys Arg Leu Leu Lys 20 <210> 12 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 12 Lys Leu Leu Arg Gln Trp Pro Ile Gly Lys Leu Leu Arg Lys Leu Leu 1
 5 10 15 Arg Lys Leu Leu Arg 20
 <210> 13 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 13 Arg Val Leu Lys Gln Trp Pro Ile Gly Arg Val Leu
 Lys Arg Val Leu 1 5 10 15 Lys Arg
 Val Leu Lys 20 <210> 14 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 14 Lys Val Leu Arg
 Gln Trp Pro Ile Gly Lys Val Leu Arg Lys Val Leu 1 5
 10 15 Arg Lys Val Leu Arg 20 <210> 15 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 15 Arg Leu Val Lys Gln Trp Pro Ile Gly Arg Leu Val Lys Arg Leu Val 1
 5 10 15 Lys Arg Leu Val Lys 20
 <210> 16 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 16 Lys Leu Val Arg Gln Trp Pro Ile Gly Lys Leu Val
 Arg Lys Leu Val 1 5 10 15 Arg Lys
 Leu Val Arg 20 <210> 17 <211> 21 <212> PRT <213>

Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 17 Lys Leu Val Arg
 Gln Phe Pro Val Gly Lys Leu Val Arg Lys Leu Val 1 5
 10 15 Arg Lys Leu Val Arg 20 <210> 18 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 18 Arg Val Val Arg Asn Trp Pro Ile Gly Arg Val Val Arg Arg Val Val 1
 5 10 15 Arg Arg Val Val Arg 20
 <210> 19 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 19 Lys Val Val Lys Asn Trp Pro Ile Gly Lys Val Val
 Lys Lys Val Val 1 5 10 15 Lys Lys
 Val Val Lys 20 <210> 20 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 20 Arg Leu Leu Arg
 Asn Trp Pro Ile Gly Arg Leu Leu Arg Arg Leu Leu 1 5
 10 15 Arg Arg Leu Leu Arg 20 <210> 21 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 21 Lys Leu Leu Lys Asn Trp Pro Ile Gly Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu 1
 5 10 15 Lys Lys Leu Leu Lys 20
 <210> 22 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 22 Arg Val Leu Arg Asn Trp Pro Ile Gly Arg Val Leu
 Arg Arg Val Leu 1 5 10 15 Arg Arg
 Val Leu Arg 20 <210> 23 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 23 Lys Val Leu Lys

Asn Trp Pro Ile Gly Lys Val Leu Lys Lys Val Leu 1 5
 10 15 Lys Lys Val Leu Lys 20 <210> 24 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 24 Arg Leu Val Arg Asn Trp Pro Ile Gly Arg Leu Val Arg Arg Leu Val 1
 5 10 15 Arg Arg Leu Val Arg 20
 <210> 25 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 25 Lys Leu Val Lys Asn Trp Pro Ile Gly Lys Leu Val
 Lys Lys Leu Val 1 5 10 15 Lys Lys
 Leu Val Lys 20 <210> 26 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 26 Arg Val Val Lys
 Asn Trp Pro Ile Gly Arg Val Val Lys Arg Val Val 1 5
 10 15 Lys Arg Val Val Lys 20 <210> 27 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 27 Lys Val Val Arg Asn Trp Pro Ile Gly Lys Val Val Arg Lys Val Val 1
 5 10 15 Arg Lys Val Val Arg 20
 <210> 28 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 28 Arg Leu Leu Lys Asn Trp Pro Ile Gly Arg Leu Leu
 Lys Arg Leu Leu 1 5 10 15 Lys Arg
 Leu Leu Lys 20 <210> 29 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 29 Lys Leu Leu Arg
 Asn Trp Pro Ile Gly Lys Leu Leu Arg Lys Leu Leu 1 5

10 15 Arg Lys Leu Leu Arg 20 <210> 30 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 30 Arg Val Leu Lys Asn Trp Pro Ile Gly Arg Val Leu Lys Arg Val Leu 1
 5 10 15 Lys Arg Val Leu Lys 20
 <210> 31 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 31 Lys Val Leu Arg Asn Trp Pro Ile Gly Lys Val Leu
 Arg Lys Val Leu 1 5 10 15 Arg Lys
 Val Leu Arg 20 <210> 32 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 32 Arg Leu Val Lys
 Asn Trp Pro Ile Gly Arg Leu Val Lys Arg Leu Val 1 5
 10 15 Lys Arg Leu Val Lys 20 <210> 33 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 33 Lys Leu Val Arg Asn Trp Pro Ile Gly Lys Leu Val Arg Lys Leu Val 1
 5 10 15 Arg Lys Leu Val Arg 20
 <210> 34 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 34 Lys Leu Val Arg Asn Phe Pro Val Gly Lys Leu Val
 Arg Lys Leu Val 1 5 10 15 Arg Lys
 Leu Val Arg 20 <210> 35 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 35 Arg Val Val Arg
 Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Gln Trp Pro Ile 1 5
 10 15 Gly Arg Val Val Arg 20 <210> 36 <211>

21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 36 Lys Val Val Lys Lys Val Val Lys Lys Val Val Lys Gln Trp Pro Ile 1
 5 10 15 Gly Lys Val Val Lys 20
 <210> 37 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 37 Arg Leu Leu Arg Arg Leu Leu Arg Arg Leu Leu Arg
 Gln Trp Pro Ile 1 5 10 15 Gly Arg
 Leu Leu Arg 20 <210> 38 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 38 Lys Leu Leu Lys
 Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Gln Trp Pro Ile 1 5
 10 15 Gly Lys Leu Leu Lys 20 <210> 39 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 39 Arg Val Leu Arg Arg Val Leu Arg Arg Val Leu Arg Gln Trp Pro Ile 1
 5 10 15 Gly Arg Val Leu Arg 20
 <210> 40 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 40 Lys Val Leu Lys Lys Val Leu Lys Lys Val Leu Lys
 Gln Trp Pro Ile 1 5 10 15 Gly Lys
 Val Leu Lys 20 <210> 41 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 41 Arg Leu Val Arg
 Arg Leu Val Arg Arg Leu Val Arg Gln Trp Pro Ile 1 5
 10 15 Gly Arg Leu Val Arg 20 <210> 42 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <

400> 42 Lys Leu Val Lys Lys Leu Val Lys Lys Leu Val Lys Gln Trp Pro Ile 1
 5 10 15 Gly Lys Leu Val Lys 20
 <210> 43 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 43 Arg Val Val Lys Arg Val Val Lys Arg Val Val Lys
 Gln Trp Pro Ile 1 5 10 15 Gly Arg
 Val Val Lys 20 <210> 44 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 44 Lys Val Val Arg
 Lys Val Val Arg Lys Val Val Arg Gln Trp Pro Ile 1 5
 10 15 Gly Lys Val Val Arg 20 <210> 45 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 45 Arg Leu Leu Lys Arg Leu Leu Lys Arg Leu Leu Lys Gln Trp Pro Ile 1
 5 10 15 Gly Arg Leu Leu Lys 20
 <210> 46 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 46 Lys Leu Leu Arg Lys Leu Leu Arg Lys Leu Leu Arg
 Gln Trp Pro Ile 1 5 10 15 Gly Lys
 Leu Leu Arg 20 <210> 47 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 47 Arg Val Leu Lys
 Arg Val Leu Lys Arg Val Leu Lys Gln Trp Pro Ile 1 5
 10 15 Gly Arg Val Leu Lys 20 <210> 48 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 48 Lys Val Leu Arg Lys Val Leu Arg Lys Val Leu Arg Gln Trp Pro Ile 1

38-35

<210> 55 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 55 Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys
 Asn Trp Pro Ile 1 5 10 15 Gly Lys
 Leu Leu Lys 20 <210> 56 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 56 Arg Val Leu Arg
 Arg Val Leu Arg Arg Val Leu Arg Asn Trp Pro Ile 1 5
 10 15 Gly Arg Val Leu Arg 20 <210> 57 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 57 Lys Val Leu Lys Lys Val Leu Lys Lys Val Leu Lys Asn Trp Pro Ile 1
 5 10 15 Gly Lys Val Leu Lys 20
 <210> 58 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 58 Arg Leu Val Arg Arg Leu Val Arg Arg Leu Val Arg
 Asn Trp Pro Ile 1 5 10 15 Gly Arg
 Leu Val Arg 20 <210> 59 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 59 Lys Leu Val Lys
 Lys Leu Val Lys Lys Leu Val Lys Asn Trp Pro Ile 1 5
 10 15 Gly Lys Leu Val Lys 20 <210> 60 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 60 Arg Val Val Lys Arg Val Val Lys Arg Val Val Lys Asn Trp Pro Ile 1
 5 10 15 Gly Arg Val Val Lys 20
 <210> 61 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>

antimicrobial peptide <400> 61 Lys Val Val Arg Lys Val Val Arg Lys Val Val Arg
 Asn Trp Pro Ile 1 5 10 15 Gly Lys
 Val Val Arg 20 <210> 62 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 62 Arg Leu Leu Lys
 Arg Leu Leu Lys Arg Leu Leu Lys Asn Trp Pro Ile 1 5
 10 15 Gly Arg Leu Leu Lys 20 <210> 63 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 63 Lys Leu Leu Arg Lys Leu Leu Arg Lys Leu Leu Arg Asn Trp Pro Ile 1
 5 10 15 Gly Lys Leu Leu Arg 20
 <210> 64 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 64 Arg Val Leu Lys Arg Val Leu Lys Arg Val Leu Lys
 Asn Trp Pro Ile 1 5 10 15 Gly Arg
 Val Leu Lys 20 <210> 65 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 65 Lys Val Leu Arg
 Lys Val Leu Arg Lys Val Leu Arg Asn Trp Pro Ile 1 5
 10 15 Gly Lys Val Leu Arg 20 <210> 66 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 400> 66 Arg Leu Val Lys Arg Leu Val Lys Arg Leu Val Lys Asn Trp Pro Ile 1
 5 10 15 Gly Arg Leu Val Lys 20
 <210> 67 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 antimicrobial peptide <400> 67 Lys Leu Val Arg Lys Leu Val Arg Lys Leu Val Arg

020020016445

Asn Trp Pro Ile 1 5 10 15 Gly Lys
 Leu Val Arg 20 <210> 68 <211> 21 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <400> 68 Lys Leu Val Arg
 Lys Leu Val Arg Lys Leu Val Arg Asn Phe Pro Val 1 5
 10 15 Gly Lys Leu Val Arg 20 <210> 69 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 220> <221> MOD_RES <222> (21) <223> AMIDATION, <400> 69 Lys Leu Val Arg
 Gln Trp Pro Ile Gly Lys Leu Val Arg Lys Leu Val 1 5
 10 15 Arg Lys Leu Val Arg 20 <210> 70 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 220> <221> MOD_RES <222> (21) <223> AMIDATION, <400> 70 Arg Leu Val Lys
 Asn Trp Pro Ile Gly Arg Leu Val Lys Arg Leu Val 1 5
 10 15 Lys Arg Leu Val Lys 20 <210> 71 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 220> <221> MOD_RES <222> (21) <223> AMIDATION, <400> 71 Lys Val Leu Arg
 Lys Val Leu Arg Lys Val Leu Arg Gln Trp Pro Ile 1 5
 10 15 Gly Lys Val Leu Arg 20 <210> 72 <211>
 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> antimicrobial peptide <
 220> <221> MOD_RES <222> (21) <223> AMIDATION, <400> 72 Arg Val Leu Lys
 Arg Val Leu Lys Arg Val Leu Lys Asn Trp Pro Ile 1 5
 10 15 Gly Arg Val Leu Lys 20

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.